

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ  
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»

**ПОКИНЬБРОДА ТЕТЯНА ЯРОСЛАВІВНА**

УДК 604.2:61.185 (043.3)

**БІОТЕХНОЛОГІЯ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ ПРОДУКТІВ БАКТЕРІЙ  
РОДУ *PSEUDOMONAS*, ЇХ ВЛАСТИВОСТІ ТА ЗАСТОСУВАННЯ**

03.00.20 – біотехнологія

**АВТОРЕФЕРАТ**  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата технічних наук

Київ-2018

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі хімії та біотехнології горючих копалин Відділення фізико-хімії горючих копалин Інституту фізико-органічної хімії і вуглехімії ім. Л.М. Литвиненка НАН України.

**Науковий керівник:** доктор технічних наук, старший науковий співробітник  
**Карпенко Олена Володимирівна**,  
Відділення фізико-хімії горючих копалин Інституту  
фізико-органічної хімії і вуглехімії ім. Л.М. Литвиненка  
НАН України,  
завідувач відділу хімії та біотехнології горючих копалин

**Офіційні опоненти:** доктор технічних наук, старший науковий співробітник,  
доцент **Голуб Наталія Борисівна**, Національний  
технічний університет України «Київський політехнічний  
інститут імені Ігоря Сікорського» МОН України,  
професор кафедри екобіотехнології та біоенергетики;

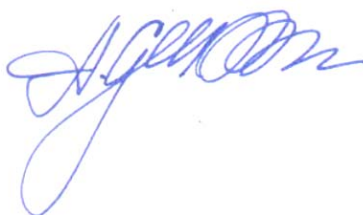
кандидат технічних наук, старший науковий співробітник  
**Науменко Оксана Василівна**, Інститут продовольчих  
ресурсів НААН України, заступник завідувача відділу  
біотехнології.

Захист відбудеться *07 грудня 2018 р.* о 10 годині 30 хвилин на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.002.28 при Національному технічному університеті України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» МОН України (03056, Україна, м. Київ, пр. Перемоги, 37, корп. 4, ауд. 258).

З дисертацією можна ознайомитися у Науково-технічній бібліотеці ім. Г.І. Денисенка Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» МОН України (03056, Україна, м. Київ, пр. Перемоги, 37).

Автореферат розісланий «\_\_\_» листопада 2018 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради  
Д 26.002.28, д.б.н., доц.



О.Ю. Галкін

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** На сьогоднішній день поверхнево-активні речовини (ПАР) широко використовуються в промисловості, сільському господарстві, медицині. Однак це, в основному, синтетичні ПАР, які, незважаючи на їх унікальні властивості, є токсичними, важко деградують у природних умовах, отже, є небезпечними для довкілля. Альтернативою їм можуть бути продукти мікробного синтезу (біоПАР, біосурфактанти), перевагами яких є висока ефективність, стійкість у широкому діапазоні температури та рН, біологічна активність (вплив на метаболізм мікроорганізмів, проникність клітинних мембран, активність ферментів тощо), а водночас біодеградабельність і низька токсичність (Mulligan et al., 2014). При створенні технологій біоПАР актуальною проблемою є пошук активних штамів-продуцентів, здатних синтезувати поверхнево-активні речовини на недорогій сировині, та оптимізація їх виробництва. Серед перспективних мікроорганізмів заслуговують уваги представники роду *Pseudomonas*, які синтезують позаклітинні рамноліпіди з високою поверхневою, емульгувальною і піноутворювальною активністю (Jadhav et al., 2018). Проте, через високу вартість виробництва біогенні ПАР поки не витримують конкуренції з синтетичними, їх економічна доступність лімітується не лише вартістю біосинтезу, а й витратами на виділення та очищення цільових продуктів. Крім того, незважаючи на підвищений практичний інтерес до ПАР мікробного походження, все ще недостатньо охарактеризовані їх фізико-хімічні та біологічні властивості, що необхідні для оцінки практичного потенціалу у конкретних галузях. Так, показники емульгування, піноутворення, міцелоутворення є важливими для трактування ролі біоПАР у мийних засобах, модифікації поверхонь, регулювання транспорту біологічно активних речовин, процесів витиснення нафти тощо (Chong and Li, 2017). Отже, розроблення раціональних технологій рамноліпідних біоПАР та визначення їх функціональних властивостей дозволить створити нові альтернативні продукти – ефективні й екологічно безпечні, які зможуть успішно замінити синтетичні ПАР у сучасних технологіях.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконана у відділі хімії і біотехнології горючих копалин Відділення фізико-хімії горючих копалин Інституту фізико-органічної хімії і вуглехімії ім. Л.М. Литвиненка НАН України в рамках наступних науково-дослідних робіт: “Фізико-хімічні основи мікробного синтезу нових біогенних поверхнево-активних речовин” (2002-2006 рр., державний реєстраційний № 0102U001755); “Створення нових екологічно безпечних матеріалів на основі каротиноїдів, полісахаридів та ПАР” (2007-2011 рр., державний реєстраційний № 0107U001276), «Фізико-хімічні основи створення вискоефективних поверхнево-активних систем на основі біогенних ліпідів, біополімерів та їх комплексів» (2011-2015 рр. державний реєстраційний № 0110U005055); «Фізико-хімічні основи використання біогенних поверхнево-активних речовин у косметичі та фармакології» (2016–2018 рр., державний реєстраційний №0116U003380); «Розроблення технології біогенних поверхнево-активних речовин та композиційних біоцидних препаратів для рослинництва» (2016-2017 рр., державний

реєстраційний № 0116U008879), «Розробка біогенних інгібіторів для захисту від корозії та біокорозії нафтогазовидобувного обладнання» (2016-2018 рр., державний реєстраційний № 0117U001347), проектів № 3200 «Розробка нових поверхнево-активних поліфункціональних регуляторів для сільського господарства та очистки довкілля», № 3494 «Биоремедиация почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами», № 5965 «Створення нових інгібіторів корозії металів для нафтогазової промисловості із застосуванням екологічно безпечних поверхнево-активних речовин: оптимізація біосинтезу ПАР та дослідження їх властивостей». Дисертантка брала участь у виконанні наведених робіт як виконавець.

### **Мета і завдання досліджень**

*Метою роботи* є розроблення біотехнології отримання поверхнево-активних речовин штамів *Pseudomonas* шляхом оптимізації умов культивування та виділення цільових продуктів, дослідження їх основних фізико-хімічних і біологічних властивостей та практичного потенціалу.

Для досягнення поставленої мети необхідно вирішити наступні **задачі**:

- провести скринінг штамів *Pseudomonas* за здатністю до синтезу ПАР;
- вивчити процеси синтезу біоПАР обраними штамми *Pseudomonas* з використанням різних субстратів, зокрема економічно вигідних, та їх сумішей;
- визначити раціональні умови синтезу ПАР штамів *Pseudomonas*, способи їх виділення, визначити склад продуктів;
- розробити технологічну схему одержання рамноліпідних ПАР – продуктів синтезу перспективного штаму-продуцента роду *Pseudomonas*;
- дослідити фізико-хімічні і біологічні властивості біоПАР штамів *Pseudomonas*;
- визначити особливості застосування поверхнево-активних продуктів штамів *Pseudomonas* у промисловості та сільському господарстві.

*Об'єкт дослідження* – біотехнології мікробного синтезу поверхнево-активних речовин.

*Предмет дослідження* – біотехнологічні параметри одержання поверхнево-активних продуктів штамів роду *Pseudomonas*, їх функціональні властивості, застосування у промисловості, сільському господарстві та охороні довкілля.

**Методи досліджень.** В експериментах використано мікробіологічні (культивування й аналіз мікроорганізмів), біотехнологічні (мікробний синтез ПАР), хімічні (аналіз вмісту рамноліпідів, полісахаридів, вуглеводнів тощо), фізико-хімічні (визначення поверхневої, емульгувальної активності, показників критичної концентрації міцелоутворення (ККМ), солюбілізації, піноутворення, змочування), спектральні, біохімічні (проникність клітинних мембран), математичні методи (математичне моделювання для оптимізації мікробного синтезу та екстракції, статистична обробка результатів) та хемоінформатики (PASS).

**Наукова новизна одержаних результатів.** При виконанні досліджень вперше одержані наступні результати. Відібрано нові перспективні штами *P. fluorescens* 8573 і *P. aureofaciens* NB-1 - продуценти рамноліпідних і ліпопептидних ПАР. Розроблено раціональні шляхи підвищення ефективності синтезу ПАР штамів *Pseudomonas*,

зокрема із застосуванням змішаних джерел вуглецю, що дозволило збільшити вихід продуктів в 1,8 разів та скоротити тривалість культивування до 4 діб. Оптимізовано способи виділення та екстракції ПАР, зокрема за допомогою багатопараметрових рівнянь. Вперше встановлено, що надосадова рідина (НОР), яка є побічним продуктом після виділення біокомплексів, володіє поверхневими, емульгувальними, змочувальними властивостями. Встановлено здатність ПАР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 активувати біорозкладання токсичного важкодеградабельного забруднювача бензпірену, а ПАР штамів *P. fluorescens* 8573 і *P. aureofaciens* NB-1 – інгібувати корозію металів і стимулювати ріст сільськогосподарських рослин. Вперше показано ефективність рамноліпідних ПАР для синтезу наночастинок срібла.

**Практичне значення одержаних результатів.** Розроблено біотехнології одержання поверхнево-активних речовин штамів *Pseudomonas*, у тому числі на економічно вигідних (дешеві рослинні олії, відходи виробництва біодизелю) та змішаних субстратах. Розроблено апаратурно-технологічну схему безвідходного виробництва біоПАР штаму на прикладі *P. fluorescens* 8573, застосування якої дозволило отримати 5 цільових поверхнево-активних продуктів та максимально використати побічні продукти постферментаційної культуральної рідини (біомасу, НОР). Встановлено доцільність використання ПАР штамів *Pseudomonas* як екологічно безпечних інгібіторів корозії металів, регуляторів росту та укорінення рослин, що підтверджено експериментами у польових умовах. Практичне значення результатів засвідчено відповідними актами впровадження та патентами України: UA № 71792 A 15.12.2004, UA № 36704, 10.11.2008.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертантом проведено критичний аналіз літератури, експериментальні дослідження з розробки технологій синтезу, виділення ПАР штамів *Pseudomonas* та особливостей їх застосування. Планування експериментів, аналіз результатів, роботи із застосування біоПАР проводили спільно з науковим керівником д.т.н. Карпенко О.В., оптимізацію синтезу ПАР *Pseudomonas* sp. PS-17 – з асп. Єрохіним В. А., оптимізацію екстракції методом багатопараметрових рівнянь – спільно з проф. Макітрою Р.Г., к.х.н. Мідяною Г.Г., токсичність ПАР на ракоподібних – з к.б.н. Шульгою О.М., гідрофільно-ліпофільний баланс, солюбілізацію – з проф. Менджицькою К. (Технічний університет Гданськ, Польща), вплив ПАР на деструкцію бензпірену – з Малаховською А. (Технічний університет, Глівіце, Польща), скринінг штамів *Pseudomonas* – з проф. Гвоздяком Р. І. (ІМВ ім. Д.К.Заболотного НАНУ), інгібування корозії металів – з д.т.н. Зінем І.М. (ФМІ ім. Г.В. Карпенко НАНУ), синтез наночастинок срібла – з к.х.н. Кицею А.Р., які є співавторами публікацій.

**Апробація результатів дисертації.** Основні результати роботи представлені на конференціях – міжнародних: «Bioremediation of soil and groundwater», Cracow, Poland, 2004; «Statistical Physics 2005: Modern problems and new applications», Lviv, 2005; «Zanieczyszczenie srodowiska produktami naftowymi, innymi antropogennymi zanieczyszczeniami organicznymi, ich analityka, monitoring i usuwanie», Ustronie, Poland, 2005, II, V Міжнародних конференціях «Молодь та поступ біології», ЛНУ ім. І.Франка, 2006, 2009 pp; II, III, IV Науково-практичних конференціях „Біотехнологія. Освіта.

Наука”, 24th European Congress on Molecular Spectroscopy EUCMOS 2008, Opatija, Croatia, конференціях «Актуальні проблеми синтезу і створення нових біологічно активних сполук та фармпрепаратів», Львів, 2008, "Стан і біорізноманіття екосистем Шацького національного парку", Шацьк, 2015; International Scientific Congress «Modern directions in chemistry, biology, pharmacy and biotechnology» 2015; Міжнародних конференціях «Біотехнологія: досвід, традиції, інновації», 2016; Lviv, Ukraine та “ABIA-2017”, Київ, 2017; XIII конференції *daRostim-2017* «Технологические аспекты современного аграрного производства и охраны окружающей среды», Алматы, Казахстан; молодих науковців КМН-2017, ФМІ ім. Г.В. Карпенка НАН України, Львів.

**Публікації.** За результатами досліджень опубліковано 38 наукових праць, у тому числі 12 статей у наукових фахових виданнях, з них 2 статті у іноземних виданнях, 2 статті у вітчизняних журналах, які представлено у наукометричних базах, 1 патент України на винахід і 1 патент України на корисну модель, 21 теза доповідей, 3 статті в інших виданнях.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів досліджень, аналізу та обговорення результатів, висновків, списку використаних джерел (226 найменувань), 5 додатків. Робота представлена на 207 сторінках друкованого тексту, містить 27 рисунків і 33 таблиці.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **першому розділі** наведено аналіз літературних даних щодо мікробного синтезу біоПАР, зокрема бактеріями роду *Pseudomonas*. Розглянуто типи мікробних поверхнево-активних речовин, їх класифікацію, технології отримання та виділення. Представлено характеристику їх базових фізико-хімічних і біологічних властивостей, а також шляхи застосування біоПАР у промисловості, сільському господарстві, медицині, охороні довкілля.

**Другий розділ** містить характеристику основних методів та методик досліджень. У роботі використано штами з колекції ВФХГК ІнФОВ НАН України: *Pseudomonas* sp. PS-17 (IMB B-7434) та *P. aureofaciens* NB-1. Штам *P. fluorescens* 8573 та інші штами роду *Pseudomonas*, а також фітопатогенні бактерії (*Agrobacterium tumefaciens*, *Clavibacter michiganensis*, *Xanthomonas campestris*, *Erwinia carotovora*) – з колекції відділу фітопатогенних бактерій IMB НАН України. Фітопатогенні гриби (*Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia cerealis*) – з ДП «Ензим». Використано тестові мікроорганізми кафедри ТБСФБ НУ «Львівська Політехніка». У роботі досліджували рослини – кукурудзу, крес-салат, буряк столовий, соняшник олійний, ріпак, пшеницю озиму, люцерну, ячмінь ярий.

Культивування бактерій проводили на ротаційній качалці (WL-2000, JV Electronic, Poland) у колбах Ерленмейєра за  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  у мінеральному поживному середовищі (ПС) (Карпенко, 2009), як джерела вуглецю використовували гліцерин, гексадекан, відходи виробництва біодизелю (технічний гліцерин - ТГ), соєву і соняшникову олії та їх суміші. Біомасу бактерій визначали гравіметрично та

спектрофотометрично (Gerhardt, 1994); полігідроксиалконоати з висушеної біомаси виділяли екстракцією хлороформом або після обробки розчинами ПАР. Поверхневий натяг (ПН) отриманих продуктів – супернатантів культуральної рідини (СКР), рамноліпідного біокомплексу (РБК), рамноліпідів (РЛ), надосадової рідини (НОР) визначали за Дю-Нуї з платиновим кільцем (Абрамзон, 1988) на тензіометрі KRÜSS K6 (KRÜSS, GmbH, Germany), критичну концентрацію міцелоутворення (ККМ) – за ізотермами ПН розчинів ПАР, CMD – як розведення КР до збереження міцелоутворення (Guerra-Santos, 1984), емульгувальну активність за (Кучер, 1990). Крайові кути змочування визначали на катетометрі КМ-8, піноутворення – за ДСТУ 3789-98, показники солюбілізації – за вмістом розчинених гідрофобних речовин на газовому хроматографі Chrompack CP 9001 (Varian Inc.). Гідрофільно-ліпофільний баланс ПАР обчислювали за формулами (Tadros, Vinsent, 1983). Вміст позаклітинних ПАР визначали гравіметрично після екстракції з СКР чи РБК різними розчинниками. Математичну обробку проводили методом багатопараметрових рівнянь (Koppel, Palm, 1973). Для визначення раціональних умов осадження біоПАР із СКР штамів *Pseudomonas* використано різні кислоти і температурні режими. Склад ліпідних ПАР визначали методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) на пластинках DC-Alufohlen Kieselgel 60 (Merck, Germany), вміст рамноліпідів – орциновим методом за рамнозним еквівалентом (РЕ) на спектрофотометрі Shimadzu UVmini-1240 (Shimadzu Corporation, Японія), молекулярну масу РБК – на капілярному віскозиметрі Оствальда (Шатенштейн, 1964). Полісахариди виділяли осадженням із СКР етанолом (Williams, 1977). Дію ПАР на проникність клітинних мембран мікроорганізмів оцінювали за кількістю вивільненого білка (Vasileva-Tonkova, 2005), чисельність життєздатних клітин – методом серійних розведень (Сегі, 1983), антимікробну активність – за зонами затримки росту тест-культур на агаризованому середовищі або на пластикових планшетах (Sarstedt, США) (Sotirova, 2012). Токсичність ПАР визначали у біотестах з *Daphnia magna* STRAUS (ДСТУ 4173-2003). Вплив ПАР на рослини визначали шляхом передпосівного оброблення насіння їх розчинами: у лабораторних умовах на чашках Петрі (ДСТУ 4138-2002) та у відкритому ґрунті (Доспехов, 1985). Концентрації вуглеводнів у ґрунті визначали на спектрофотометрі SPECORD-80 (Штивель, 1985), концентрацію бензпірену – на газовому хроматографі HP 6890 GC (Hewlett-Packard, США). Інгібування корозії сталі Ст3 вивчали гравіметрично (Слободян З., 2012) та методом потенціодинамічної поляризації на потенціостаті Gill AC. Наночастинки срібла (AgNP) синтезовані шляхом змішування 1 см<sup>3</sup> 0,1 М розчину AgNO<sub>3</sub> з 100 см<sup>3</sup> розчинів рамноліпідних ПАР (1 г/дм<sup>3</sup>) за 70°C. Для статистичного аналізу використовували варіаційну статистику (Лакін, 1990), програму Excel, для прогнозування біологічної активності – комп'ютерну програму PASS.

У третьому розділі «Синтез ПАР штамми роду *Pseudomonas*» представлено результати скринінгу продуцентів за здатністю до синтезу ПАР, критеріями якого були: поверхневий натяг СКР, показники CMD, індекс емульгування E<sub>24</sub>. У результаті вивчення 21 культури *Pseudomonas* відібрано 3 штамми-продуценти ПАР: *P. aureofaciens* NB-1, *P. fluorescens* 8573 та *Pseudomonas* sp. PS-17. Виявлено, що штам

*P. aureofaciens* NB-1 синтезує ПАР двох типів – рамноліпіди та ліпопептиди, що підтверджено даними ТШХ і ІЧ-спектрометрії.

**Використання економічно вигідних субстратів для синтезу ПАР штамми *Pseudomonas*.** Досліджено синтез ПАР обраних штамів *Pseudomonas* на ПС з субстратами різної природи і походження, зокрема економічно вигідними. Показано, що при вирощуванні *Pseudomonas* sp. PS-17 на соєвій олії порівняно з гліцерином та сумішшю субстратів зростає біомаса, вихід РБК й ліпідних ПАР (табл.1).

Таблиця 1

**Визначення раціональних джерел вуглецю для синтезу ПАР штамми роду *Pseudomonas***

Штам	Джерело вуглецю, 4%	АСБ, г/дм <sup>3</sup>	ПАР, г/дм <sup>3</sup>	РБК, г/дм <sup>3</sup>	Поверхневий натяг, мН/м	E <sub>24</sub> , %
<i>Pseudomonas</i> sp. PS-17	Соєва олія	3,9±0,3	8,2±0,4	9,8±0,3	29,5±0,5	45,8±0,4
	Соєва олія + гліцерин (1:3)	3,6±0,2	7,7±0,4	7,0±0,3	29,0±0,5	60,1±0,8
	гліцерин	3,3±0,2	5,5±0,3	5,1±0,4	29,0±0,5	60,6±0,5
<i>P. fluorescens</i> 8573	Соєва олія	3,1±0,2	9,4±0,3	10,5±0,4*	28,5±0,5	40,5±0,5
	Соєва олія + гліцерин (1:3)	4,9±0,4	8,4±0,3	7,6±0,3	28,5±0,5	58,2±0,6
	гліцерин	2,9±0,3	5,3±0,2	5,2±0,4	28,5±0,5	60,2±0,8
<i>P. aureofaciens</i> NB-1	Соєва олія	3,9±0,3	6,8±0,3	-	39,0±0,5	2,5±0,5
	Соєва олія+ гліцерин (1:3)	3,8±0,2	5,4±0,3	-	31,0±0,5	6,5±0,5
	гліцерин	3,3±0,2	3,1±0,2	-	26,5±0,5	50,0±0,8

Примітки: АСБ - абсолютно суха біомаса; РБК-рамноліпідний біокомплекс; E<sub>24</sub>-індекс емульгування, - — не осаджується, \*результати достовірні за  $p \leq 0,05$

Для продуктів *P. fluorescens* 8573, отриманих на цих субстратах, спостерігалась та ж тенденція – збільшення біомаси, виходу РБК і ПАР на соєвій олії. Проте індекс емульгування СКР, отриманого на олії, є дещо нижчим (E<sub>24</sub> 45%), ніж на гліцерині і суміші – E<sub>24</sub> 60%, що можна пояснити різним складом одержаних ПАР (збільшенням вмісту жирних кислот). *P. aureofaciens* NB-1 синтезує більш активні ПАР на гліцерині, про що свідчать низький поверхневий натяг СКР (28 мН/м) та E<sub>24</sub> – 50%. Отже, продукти штамів *Pseudomonas*, отримані на гліцерині або його суміші із соєвою олією, є ефективними ПАР, що підтверджується їх фізико-хімічними показниками.

Також встановлено здатність досліджених штамів до синтезу ПАР у середовищах з відходами виробництва біодизелю (гліцеринова фракція, технічний гліцерин - ТГ) як джерелом вуглецю (табл. 2). При вирощуванні штамів *Pseudomonas* на ТГ (2-10% мас) встановлено, що із збільшенням його вмісту зростають біомаса (на 11-20%), вміст ліпідів і РБК. Ймовірно, наявність у складі ТГ фосфоліпідів і мікроелементів сприяє інтенсифікації біосинтезу. Попри збільшення загального виходу ліпідних ПАР штамів *Pseudomonas*, за даними ТШХ показано, що у їх складі зростає вміст жирних кислот за концентрацій ТГ, більших 4%.



Таблиця 2

**Синтез ПАР штамами *Pseudomonas* у середовищах з гліцерином і технічним гліцерином**

штам	Субстрат (4% мас.)	АСБ, г/дм <sup>3</sup>	Е <sub>24</sub> , %		ПАР, г/дм <sup>3</sup>	Поверхневий натяг, σ, мН/м
			Вазелінова олива	Соняшникова олія		
<i>Pseudomonas</i> sp. PS-17	гліцерин	3,5±0,2	20,0±0,5	40,5±0,5	5,5±0,3	30,5±0,5
	ТГ	3,9±0,3	12,5±0,5	25,5±0,5	5,9±0,4	32,3±0,7
<i>P. fluorescens</i> 8573	гліцерин	2,9±0,2	54,5±0,5	54,0±0,4	5,3±0,4	28,5±0,5
	ТГ	6,5±0,4	19,6±0,4	42,2±0,4	14,3±0,9*	34,4±0,4
<i>P. aureofaciens</i> NB-1	гліцерин	3,3±0,3	20,5±0,5	16,3±0,5	3,1±0,2	26,5±0,5
	ТГ	4,3±0,2	0,5±0,5	11,6±0,7	12,9±0,5	32,6±0,6

Примітки: АСБ- абсолютно суха біомаса; Е<sub>24</sub>-індекс емульгування; ТГ-технічний гліцерин;

\*результати достовірні за  $p \leq 0,05$

**Оптимізація поживних середовищ та підбір джерел вуглецю для культивування штаму *Pseudomonas* sp. PS-17.** Проведено оптимізацію ПС для штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 методом адитивно-решітчатих рівнянь. Підбрано склад інокуляційного і ферментаційного середовищ (для біомаси – на першу добу і ПАР – на п'яту добу) та визначено оптимальні співвідношення С:N (табл. 3).

Таблиця 3

**Оптимізація складу поживних середовищ для отримання біомаси та цільових продуктів штаму *Pseudomonas* sp. PS-17**

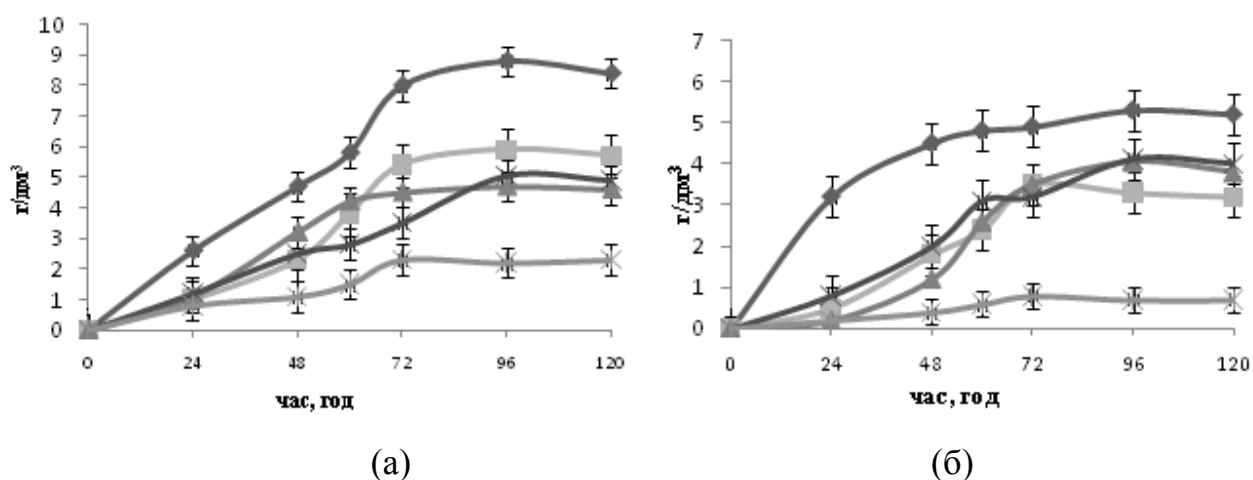
Цільовий продукт	Склад поживного середовища, г/дм <sup>3</sup>						Співвідно- шення С:N
	Гліцерин	NaNO <sub>3</sub>	Цитрат натрію	КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub>	К <sub>2</sub> НРО <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub> ×5H <sub>2</sub> O	
Біомаса	30	5	5	2	1,2	0,5	14:1
Біокомплекс	30	5	4	2	1,2	0,5	14:1
Ліпіди загальні	40	6	5	2	1,2	0,5	16:1
Рамноліпіди	30	4	4	2	1,2	0,5	18:1
Полісахариди	30	6	4	2	1,2	0,5	12:1

Досліджено синтез ПАР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 у середовищах з різними джерелами вуглецю та їх сумішами: гексадекан з гліцерином, гексадекан з глюкозою, олія з гліцерином, етанол з глюкозою. Синтезувальна здатність культури на ПС з моносубстратами коливалась від 0,38 г/г (на гексадекані) до 1,25 г/г – на олії, а на дисубстратах – від 0,33 г/г (етанол+глюкоза) до 3,12 г/г (гексадекан+гліцерин 1:6). Найкращий ефект відмічено при синтезі ПАР на гексадекані з гліцерином: вміст РБК за співвідношення 1:6 зростав у 1,74 рази, а вміст РЛ – у 1,3 рази щодо гліцерину. Це узгоджується з даними про ефективність змішаних субстратів, яка залежить не тільки від їх природи, але й співвідношень (Пирог та ін, 2012).

Проаналізовано динаміку синтезу ПАР у середовищах з гексадеканом і гліцерином за різних співвідношень 1:2, 1:4 та 1:6. Показники синтезу досягали максимуму через 96 год, причому за 1:6 вміст РБК був найбільшим – 8,8 г/дм<sup>3</sup> (рис. 1).

Результати свідчать про перспективність змішаного субстрату гексадекан+гліцерин 1:6 для синтезу ПАР *Pseudomonas* sp. PS-17, технологічними й економічними перевагами цього підходу є короткий термін ферментації (4 доби) і високий вихід продуктів – 4,9 г/дм<sup>3</sup> рамноліпідів (за РЕ) і 8 г/дм<sup>3</sup> РБК.

Досліджено також вплив РЛ (як попередників синтезу ПАР) у ПС *Pseudomonas* sp. PS-17 на вихід ПАР, що представляє інтерес як з наукової, так і практичної точки зору для інтенсифікації біосинтезу різних речовин. Визначено, що за додавання РЛ у кількості 0,05 і 0,1 г/дм<sup>3</sup>, вміст РБК зростає у 1,8-2,5 рази до 12,1 г/дм<sup>3</sup> (на гексадекані з гліцерином 1:6).



**Рис.1.** Динаміка синтезу РБК (а) і рамноліпідів (б, за РЕ) штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 на різних субстратах (♦ – гексадекан+гліцерин 1:6, ■ – гексадекан+гліцерин 1:4, ▲ - гексадекан+гліцерин 1:2, ×- гліцерин, \*-гексадекан).

Отже, для синтезу ПАР *Pseudomonas* sp. PS-17 кращими субстратами є гексадекан-гліцерин 1:6 з додаванням у ПС 0,05 г/дм<sup>3</sup> РЛ.

**Розроблення та удосконалення способів виділення поверхнево-активних продуктів.** Доступність біоПАР на світовому ринку можна підвищити не тільки за рахунок застосування дешевих субстратів, а й удосконалюючи процеси виділення продуктів, з огляду на їх структуру і склад. Натепер найбільше використовують методи екстракції розчинниками, які часто є недостатньо ефективними. Встановлено, що ПАР *Pseudomonas* sp. PS-17 і *P. fluorescens* 8573 доцільно виділяти із СКР кислотним осадженням з отриманням осаду РБК і надосадової рідини (НОР). Для удосконалення вилучення РБК досліджено вплив природи кислот і температурних режимів (табл.4). Визначено раціональний режим кислотного осадження поверхнево-активних комплексів – нагрівання СКР до 100°C упродовж 25 хв. Найбільшого виходу комплексу *Pseudomonas* sp. PS-17 досягнуто за використанням HCl – 6,59 г/дм<sup>3</sup>, а для *P. fluorescens* 8573 – з H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 6,20 г/дм<sup>3</sup> (табл.4). Перевагою розробленого способу є економія часу та енергетичних витрат за рахунок відсутності етапу охолодження підкисленого СКР та збільшення виходу продукту.

Таблиця 4

**Вибір раціональних параметрів для осадження біоПАР штамів *Pseudomonas***

Кислота	<i>Pseudomonas sp.</i> PS-17				<i>P. fluorescens</i> 8573			
	4°C, 24 год		100°C, 25 хв		4°C, 24 год		100°C, 25 хв	
	РБК, г/дм <sup>3</sup>	Ліпіди в НОР, г/дм <sup>3</sup>	РБК, г/дм <sup>3</sup>	Ліпіди в НОР, г/дм <sup>3</sup>	РБК, г/дм <sup>3</sup>	Ліпіди в НОР, г/дм <sup>3</sup>	РБК, г/дм <sup>3</sup>	Ліпіди в НОР, г/дм <sup>3</sup>
CH <sub>3</sub> COOH	4,57±0,16	3,9±0,3	5,88±0,12	3,5±0,2	4,39±0,12	4,2±0,3	5,71±0,13	3,4±0,3
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	5,39±0,12	4,6±0,3	6,20±0,13	3,9±0,3	5,68±0,15	4,8±0,2	5,79±0,21	3,7±0,2
HCl	5,44±0,15	4,6±0,4	6,59±0,15	3,3±0,3	5,21±0,16	4,4±0,2	6,13±0,26	3,5±0,3
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5,41±0,21	4,5±0,5	5,86±0,15	3,7±0,3	5,17±0,13	4,2±0,3	6,20±0,19*	3,6±0,3
HNO <sub>3</sub>	5,32±0,31	4,8±0,5	6,39±0,18	3,1±0,2	5,54±0,14	4,6±0,2	5,63±0,18	3,9±0,2

Примітки: РБК-рамноліпідний біокомплекс; НОР – надосадова рідина; \*результати достовірні за  $p \leq 0,05$

Підібрано оптимальні екстрагенти для вилучення рамноліпідів з РБК штаму *Pseudomonas sp.* PS-17 методом багатопараметрових рівнянь – це вищі триалкіламіни з високою основністю (трибутиламін, хінолін). Таким же методом розраховано й оптимальні екстрагенти ПАР з СКР штамів *P. fluorescens* 8573 та *P. aureofaciens* NB-1. Оскільки ПАР *P. aureofaciens* NB-1 екстрагують з КР, проведено пошук раціональних екстрагентів серед низки розчинників різної будови. Кращими екстрагентами були бутанол, ізобутанол, етилацетат. Вихід ПАР за використання етилацетату становив 2,38 г/дм<sup>3</sup> (рН 3), а з сумішшю етилацетату й ізопропанолу 2:1 (рН 11) виділено 3,71 г/дм<sup>3</sup> продукту.

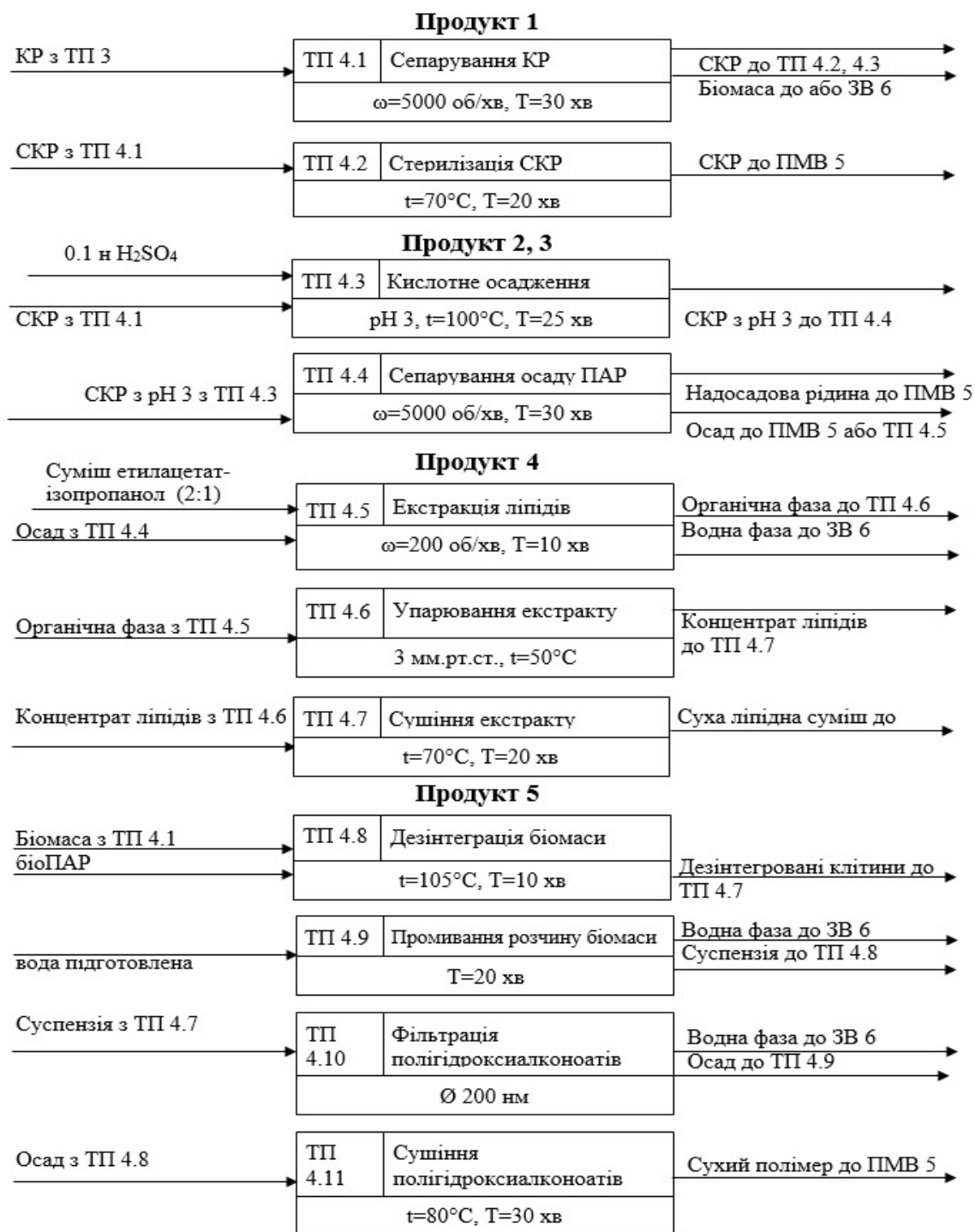
Економічну доступність нових біоПАР було підвищено не тільки за рахунок удосконалення методів отримання, а й максимального використання компонентів постферментаційної КР (біомаси, СКР, рамноліпідного комплексу, НОР після осадження РБК. Ще одним продуктом є полігідроксиалканоати (ПГА) – клітинні полімери, основними компоненти яких є  $\beta$ -гідроксіалканові кислоти. ПГА є потенційними екологічно чистими замінниками синтетичних пластмас через їх біодеградабельність. Розроблено раціональний спосіб виділення ПГА – оброблення сухих клітин розчином біогенних ПАР (РБК, 8 г/дм<sup>3</sup>), перевагами якого порівняно з екстракцією хлороформом чи синтетичними ПАР є його екологічна безпечність.

Отже, визначено перспективні штами роду *Pseudomonas* – продуценти біоПАР, опрацьовано раціональні підходи до синтезу та виділення цільових продуктів.

У розділі 4 «Технологія одержання ПАР штаму *P. fluorescens* 8573» наведено технологічно-апаратурні схеми отримання продуктів у формі СКР, рамноліпідного біокомплексу, НОР, рамноліпідів, полігідроксиалканоатів.

Технологічний процес одержання ПАР, синтезованих *P. fluorescens* 8573 складається із основних етапів (приготування ПМ, культивування у ферментері, сепарація КР, осадження, виділення РБК, екстракція рамноліпідів з РБК, їх сушіння, а також виділення полігідроксиалканоатів з біомаси) та допоміжних робіт, фрагмент технологічної схеми процесу виробництва наведено на рис. 2. Схема може бути реалізована на стандартному біотехнологічному обладнанні, її особливістю є

застосування ферментера з вихровою системою аерації. Доцільність його використання для виробництва біоПАР бактерій *Pseudomonas* показано раніше (Карпенко, 2012).



**Рис.2.** Фрагмент технологічної схеми процесу виробництва біоПАР *P. fluorescens* 8573.

Проведено SWOT-аналіз розроблених ПАР, який використовується для стратегічного планування впровадження нових продуктів і технологій. Відзначено, що

перевагами біоПАР перед синтетичними є висока ефективність, термостійкість, нетоксичність, біосумісність та здатність до біорозкладання. Для їх синтезу можна використовувати поновлювану сировину, зокрема відходи виробництв. Показано, що їх прогнозована вартість становить 70-180 USD/кг залежно від концентрації, тоді як для комерційних біоПАР (Urumqi Unite Bio-Technology, AGAE Technologies) – 320-1600 USD/кг.

Отже, розроблено безвідходну технологію біоПАР штаму *P. fluorescens* 8573 з максимльним використанням компонентів постферментаційної КР (біомаса, СКР, РБК, НОР, полігідроксиалконоати), яка дасть змогу підвищити їх конкурентоспроможність.

У розділі 5 «Характеристики поверхнево-активних продуктів штамів *Pseudomonas*» наведено результати досліджень основних фізико-хімічних і біологічних властивостей ПАР обраних штамів *Pseudomonas*. Встановлено, що отримані продукти характеризуються високою емульгувальною, поверхневою, піноутворювальною змочувальною активністю, тобто є ефективними ПАР. Встановлено низькі значення поверхневого натягу розчинів СКР: штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 – 29 мН/м, штаму *P. fluorescens* 8573 – 28 мН/м, *P. aureofaciens* NB-1 – 26 мН/м. Визначено, що моно- і диамноліпіди *Pseudomonas* sp. PS-17 є високоефективними ПАР – їх поверхневий натяг для становив 24 та 28 мН/м відповідно, критична концентрація міцелоутворення – 131,8 мг/дм<sup>3</sup>. Розрахований гідрофільно-ліпофільний баланс РЛ1 становив 13, а РЛ2 – 21, що вказує на здатність утворювати стабільні емульсії «олія у воді». Визначено, що молекулярна маса одного з перспективних продуктів *Pseudomonas* sp. PS-17 – рамноліпідного біокомплексу становить 7,5-9 тис Да, також для нього розраховано кількісні показники солюбілізації щодо додекану: масовий коефіцієнт – 0,0855, а мольний – 4,02. Це свідчить про доцільність використання РБК для покращення розчинності малорозчинних у воді речовин, що є перспективним для композиційних препаратів різного призначення. Встановлено здатність СКР штамів *Pseudomonas* до емульгування гідрофобних речовин: мастила А1, бензолу, гексадекану, циклогексанолу, вазелінової оливи, нафти, рослинних олій – за індексом емульгування і стабільністю у часі.

Вивчено також властивості надосадових рідин, отриманих після кислотного осадження комплексів із СКР штамів *Pseudomonas* за різних температур (табл. 5). Показано, що поверхневий натяг НОР складав 31-34 мН/м, оскільки у ній залишається 3-5 г/дм<sup>3</sup> ліпідних ПАР. Препарати, отримані підкисленням СКР з охолодженням, емульгували гідрофобні речовини: показник E<sub>24</sub> для соняшникової олії складав 45-59%, вазелінової оливи – 40-50%. Також визначено здатність НОР до змочування різних поверхонь: крайовий кут змочування листків герані становив 15-30°, а поверхні політетрафлуоретену – 40° (вода практично не змочує ці поверхні – 90° та 110° відповідно).

Отже, зважаючи на фізико-хімічні властивості НОР можна застосовувати як дешеві поверхнево-активні продукти у сучасних технологіях.

Таблиця 5

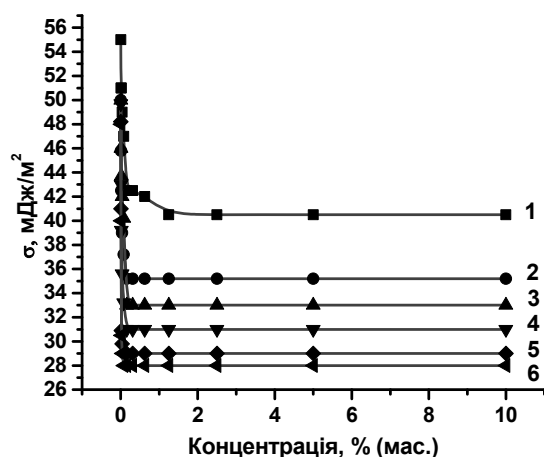
**Фізико-хімічні властивості надосадових рідин, отриманих різними способами (рН 7)**

НОР	Умови	Е <sub>24</sub> , %		Стійкість піни, %	ПАР, г/дм <sup>3</sup>	Кути змочування (θ), град.	
		Сон. олія	Ваз. олива			ПТФ	Листок герані
HCl	4°C, 24 год	59,2±0,8	50,2±0,8	92,2±0,8*	3,3±0,3	40,3±0,7	15,5±0,5
	100°C, 25 хв	20,5±0,5	1,5±0,5	50,3±0,7	4,6±0,4	40,3±0,7	75,3±0,7*
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4°C, 24 год	45,7±0,3	40,3±0,7	93,5±0,5	3,7±0,3	42,5±0,5	30,4±0,6
	100°C, 25 хв	5,0±0,5	1,2±0,8	80,5±0,5	4,5±0,3	75,6±0,4	75,4±0,5

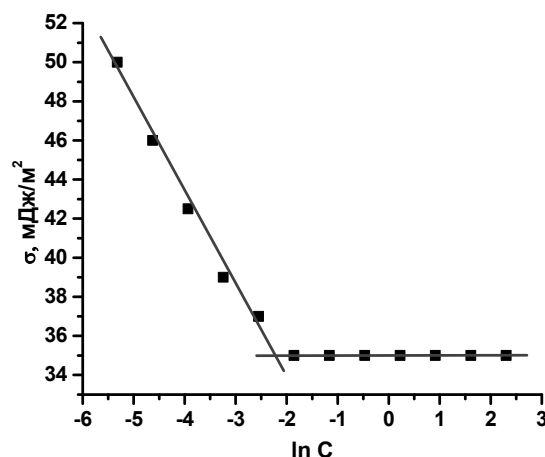
Примітки: ПАР-поверхнево-активні речовини; Е<sub>24</sub>-індекс емульгування; ПТФ – політетрафлуоретен,

\*результати достовірні за  $p \leq 0,05$

Встановлено, що у розчинах цих сумішей Твін-80 менше впливає на поверхневу активність, а РБК – найбільше (рис. 3). Залежності ПН від вмісту компонентів є традиційними для колоїдних ПАР – ділянки стрімкого падіння ПН і його сталих значень за концентрацій, більших ККМ (рис. 4). Вивчено залежність поверхневого натягу розчинів сумішей Твін-80 і РБК різного складу від їх загальної концентрації. Показано, що значення ПН сумішей Твін-80 з РБК менші за адитивні величини (для ідеальної змішаної міцели). Це свідчить, що у міцелах і розчині між Твін-80 і РБК є міжмолекулярні взаємодії, енергія яких відмінна від енергій взаємодій між молекулами кожного компонента.



**Рис. 3.** Залежність поверхневого натягу розчинів Твін-80 (1), РБК (6), їх сумішей від загальної концентрації ПАР (вміст РБК у суміші: 2 – 11,1; 3 – 25,0; 4 – 42,9; 5 – 66,7 % (мас).



**Рис. 4.** Визначення ККМ суміші з 88,9 % Твін-80 і 11,1 % РБК по залежності поверхневого натягу від логарифму концентрації.

Суміші Твін-80 (0,5 г/дм<sup>3</sup>) з РБК (1 г/дм<sup>3</sup>) за співвідношення 2:1 володіли найбільшою емульгувальною активністю, їх емульсії з олією були стабільними і через

5 діб. Отже, синергетична дія РБК з Твін-80 дозволяє зменшити дозу синтетичних ПАР та відповідно їх негативну дію.

Для раціонального застосування отриманих ПАР досліджено також їх біологічні властивості, зокрема вплив на проникність мембран клітин мікроорганізмів. Порівняно з синтетичними ПАР (натрій додецилсульфат, Твін-80), синтезовані нові біоПАР мали більш «м'який» вплив на клітини. Так, за концентрацій до 1 г/дм<sup>3</sup> синтетичні ПАР спричиняли загибель клітин, тоді як біоПАР лише змінювали проникність мембран, що можна пояснити утворенням супрамолекулярних комплексів ПАР з мембранними фосфоліпідами (Пашинская, 2009). Здатність біоПАР до регулювання проникності клітинних мембран є перспективною для підсилення дії біологічно активних засобів, а також для вивільнення ферментів, білків з клітин.

Екологічну доцільність застосування отриманих біоПАР підтверджено показниками їх низької токсичності. Так, СКР *Pseudomonas* sp. PS-17 за розведення у 50 раз, розчини РЛ (менше 0,1 г/дм<sup>3</sup>), РБК (менше 0,05 г/дм<sup>3</sup>) не чинили токсичної дії на ракоподібних *Daphnia magna* STRAUS. НОР у розведеннях до 1:32 та біокомплекс штаму *P. fluorescens* 8573 (0,075 г/дм<sup>3</sup>) не виявляли гострої летальної токсичності, СКР штаму *P. fluorescens* 8573 (1:70) є слаботоксичною речовиною.

Для використання ПАР штамів *Pseudomonas*, визначення потенціалу НОР у сільському господарстві досліджено їх фітотоксичний вплив щодо крес-салату *Lepidium sativum*. Показано, що надосадові рідини *Pseudomonas* sp. PS-17 за розведень у 10 разів не тільки не проявляли інгібувального ефекту, а й стимулювали ріст рослин. На 4 добу приріст стебла в середньому був на 5-18% вищим, ніж у контролі. Отже, доведено безпечність отриманих продуктів та визначено їх раціональні концентрації.

Таким чином, унікальні фізико-хімічні і біологічні властивості одержаних біоПАР, їх низька токсичність, помірна дія на клітини мікроорганізмів і рослин є вагомим аргументом для їх використання як екологічно безпечних продуктів у сучасних технологіях промисловості і сільського господарства.

У розділі 6 «Застосування поверхнево-активних продуктів штамів роду *Pseudomonas*» проведено прогноз біологічної активності за структурною формулою рамноліпідів за допомогою комп'ютерної програми PASS для прогнозування їх активності і відповідно практичного потенціалу як біологічно активних препаратів. Виявлено, що РЛ можуть мати вазопротекторну, імуностимулюючу, противірусну, антитромботичну, гепатопротекторну дію, інгібувати низку ферментів, регулювати проникність клітинних мембран. Результати конкретизують напрямки подальших досліджень біоПАР як фармацевтичних і ветеринарних препаратів.

Для встановлення антимікробної активності отриманих біоПАР штамів *Pseudomonas* вивчено їх дію щодо різноманітних бактерій і грибів, зокрема фітопатогенних мікроорганізмів (табл. 6). Показано, що СКР всіх досліджених штамів володіли антибактеріальною активністю, причому ПАР *Pseudomonas* sp. PS-17 мали найбільшу інігібувальну дію щодо тестових фітопатогенів. Виявлено й фунгіцидні властивості біоПАР щодо грибів *A. alternata*, *F. oxysporum*, *Rh.cerealis*.

Таблиця 6

Антимікробна активності біоПАР штамів *Pseudomonas*

Культури мікроорганізмів- фітопатогенів	СКР штаму <i>P. aureofaciens</i> NB-1		СКР штаму <i>P. fluorescens</i> 8573		СКР <i>Pseudomonas</i> sp. PS-17	
	МІК, мкг/см <sup>3</sup>	МБК, мкг/см <sup>3</sup>	МІК, мкг/см <sup>3</sup>	МБК, мкг/см <sup>3</sup>	МІК, мкг/см <sup>3</sup>	МБК, мкг/см <sup>3</sup>
<i>C. michiganensis</i>	-	-	-	-	30	500
<i>A. tumefaciens</i>	62,5	250	125	2000	300	500
<i>P. syringae</i>	250	500	-	-	100	1000
<i>E. carotovora</i>	-	-	125	125	200	200
<i>X. campestris</i>	-	-	-	-	100	1000

Примітки: СКР – супернатант культуральної рідини; МІК – мінімальна інгібувальна та МБК – мінімальна бактерицидна концентрації; - відсутня антимікробна дія

Найбільші зони затримки росту тест-культур встановлено для СКР штамів *Pseudomonas* sp. PS-17 і *P. fluorescens* 8573 – 2,7 см й 2,2 см (для *A. alternata*), 3,2 см і 2,8 см (для *F. oxysporum*) відповідно. Визначені антимікробні властивості ПАР штамів *Pseudomonas* обумовлюють перспективність їх використання у сільському господарстві у складі комплексних засобів захисту рослин.

Визначено перспективи одержаних ПАР штамів *Pseudomonas* як регуляторів росту рослин. Так, показано їх стимулювальну дію на ріст ріпака (*Brassica napus*) та пшениці озимої (*Triticum aestivum* L.) у польових умовах. За обробки насіння розчином СКР *Pseudomonas* sp. PS-17 (1:200) маса кореневої і надземної частини ріпаку збільшилась на 19 і 17%, пшениці – на 15,6 і 34,8% відповідно, схожість насіння пшениці зросла на 18%. За дії СКР штамів *P. aureofaciens* NB-1 і *P. fluorescens* 8573 надземна частина ріпаку збільшилась на 15%, а пшениці – на 10-15% щодо контролю.

Показано ефективність передпосівної обробки насіння рослин новим дешевим продуктом – НОР. Так, при замочуванні насіння кукурудзи (*Zea mays*) у розчині НОР (1:25) приріст пагона збільшився на 55% порівняно з контролем, а у розчині РБК (0,01 г/дм<sup>3</sup>) – пагін збільшувався удвічі. За обробки насіння кукурудзи культуральною рідиною *P. aureofaciens* NB-1 (1:100) або розчинами НОР і РБК штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 приріст довжини кореня у середньому становив 60%.

У наш час зростає інтерес до біодобрих – препаратів на основі азотфіксувальних бактерій, які мають переваги перед мінеральними з екологічної та економічної точки зору. Встановлено, що біоПАР *Pseudomonas* sp. PS-17 сприяли підвищенню функціональної активності симбіотичних й асоціативних азотфіксаторів родів *Sinorhizobium*, *Enterobacter* (Патент України №36704). Розроблено ефективні комплексні біодобрива шляхом додавання біоПАР під час вирощування азотфіксаторів або до готових культуральних рідин. За обробки насіння ячменю біодобривом на основі *Enterobacter* sp. з РБК *Pseudomonas* sp. PS-17 (0,05 г/дм<sup>3</sup>) маса надземної частини збільшилась на 23%, кореневої – на 24% порівняно з самим азотфіксатором. Обробка насіння люцерни культурою *S. meliloti* ЛН11 і РБК сприяла підвищенню нодуляційної



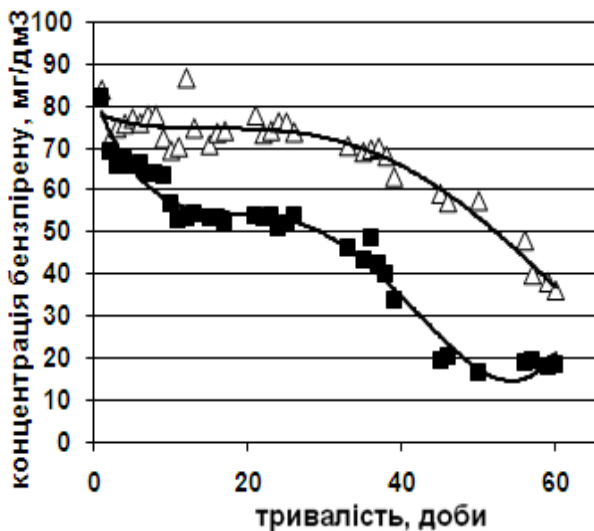
активності (кількості бульбочок) на 30,2%. Ефективність отриманих біодобрив доведено як у лабораторних, так і у польових випробуваннях.

Також встановлено, що розроблені поверхнево-активні системи РБК з Твін-80 за співвідношення 2:1 (вміст РБК – 0,02 г/дм<sup>3</sup>) стимулювали ріст соняшника за передпосівного оброблення насіння.

Отже, завдяки властивостям отримані біоПАР можна використовувати в екологічно безпечних агропрепаратах, як окремо, так і у композиціях, що сприятиме зростанню врожайності, якості продукції, збереженню родючості ґрунтів.

Розглянуто практичні перспективи біоПАР для ремедіації нафтозабруднених ґрунтів. У модельних експериментах показано, що при застосуванні асоціації бактерій-деструкторів разом з КР *Pseudomonas* sp. PS-17 і сорбентом глауконітом упродовж місяця вміст вуглеводнів зменшився на 67%.

Встановлено доцільність використання РЛ для біорозкладання бензпірену (БП) – одного з найбільш важкодеградабельних і токсичних забруднювачів довкілля (рис.5). Досліджено кінетику розкладу БП (0,1 мг/см<sup>3</sup>) за дії рамноліпідів *Pseudomonas* sp. PS-17 (0,5 мг/см<sup>3</sup>). Суттєве зниження концентрації бензпірену відмічено у перші 30 днів, а ступінь його розкладу в цілому зріс на 18%. Ймовірно, що дія біоПАР на очищення ґрунтів і води сприяє збільшенню біодоступності забруднень, їх транспорту у мікробні клітини, що стимулює метаболічну активність ґрунтових деструкторів.

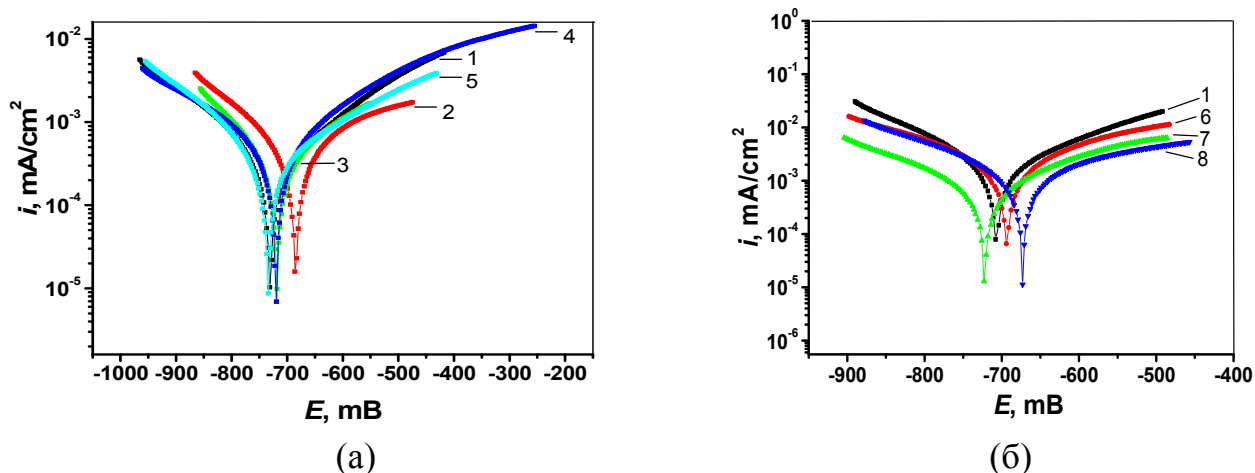


**Рис. 5.** Динаміка розкладання бензпірену за дії рамноліпідів (■ – з РЛ, Δ - без РЛ).

інгібували корозію сталі Ст3 у слабокислому дощовому розчині (рис. 6). Визначено, що електрохімічна корозія у водних розчинах ПАР протікала при змішаному контролі зі зсувом потенціалу корозії  $E_{cor}$  у бік позитивних значень. У розчинах СКР штамів *P. aureofaciens* NB-1 та *P. fluorescens* 8573 також зафіксовано зменшення величини струму корозії  $I_{cor}$  (рис.6).

Новим напрямком застосування отриманих ПАР є «зелений» синтез наночастинок срібла (AgNP), в якому РЛ та РБК (1 г/дм<sup>3</sup>) виконують роль редукуючих агентів і стабілізаторів одночасно завдяки їх властивостям. Дані УФ/Віз-спектроскопії та хлоридного тесту показали утворення стійких AgNP-вмісних золь (100% перетворення іонів  $Ag^+$ ), середній діаметр одержаних AgNP – 40 і 50 нм (з РЛ і РБК відповідно). Встановлено, що AgNP, модифіковані РБК, володіють значно вищою антимікробною активністю щодо фітопатогена *A. tumefaciens*, ніж AgNP, з РЛ.

Вперше показано можливість застосування ПАР штамів *P. aureofaciens* NB-1 та *P. fluorescens* 8573 як екологічно безпечних інгібіторів корозії металів. Ці біоПАР



**Рис.6.** Інгібування корозії сталі Ст 3 за даними потенціодинамічних поляризаційних залежностей за дії СКР штамів *P. aureofaciens* NB-1(а) та *P. fluorescens* 8573 (б) у розведеннях: 1 – контроль, 2 – 1:5, 3 – 1:10, 4 – 1:25, 5 – 1:50, 6 – 0,1 г/дм<sup>3</sup>, 7 – 0,25 г/дм<sup>3</sup>, 8 – 0,5 г/дм<sup>3</sup> (у слабнокислому дощовому розчині).

Ефективність інгібування корозії у розчинах біоПАР збільшувалась із ростом їх концентрації до значень ККМ. Механізм інгібування корозії, ймовірно, полягає в адсорбції молекул ПАР на поверхні сплаву з утворенням бар'єрної плівки.

Отже показано, що завдяки поліфункціональним властивостям й екологічній безпеці отримані ПАР штамів *Pseudomonas* будуть конкурентоспроможними на сучасному ринку як самостійні продукти та складові комплексних препаратів для сучасних технологій промисловості і сільського господарства.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі обґрунтовано і практично розв'язано важливе науково-технологічне завдання – розроблення біотехнології отримання поверхнево-активних продуктів бактерій роду *Pseudomonas*, дослідження їх властивостей та визначення напрямків практичного застосуванні. Зокрема:

1. У результаті скринінгу знайдено нові продуценти поверхнево-активних речовин – штами *P. fluorescens* 8573 та *P. aureofaciens* NB-1, які синтезують ПАР двох типів – рамноліпіди та ліпопептиди.

2. Встановлено доцільність застосування змішаних субстратів, рослинних олій, відходів виробництв для синтезу ПАР штамів *P. aureofaciens* NB-1, *P. fluorescens* 8573 і *Pseudomonas* sp. PS-17. Вихід ПАР на суміші гексадекан-гліцерин 1:6 зростає у 1,8 разів за скорочення тривалості синтезу на 3 доби. Оптимізовано умови синтезу ПАР на прикладі штаму *Pseudomonas* sp. PS-17, підбрано склад інокуляційного та ферментаційного поживних середовищ (співвідношення С:N – 14:1 та 18:1 відповідно).

3. На основі експериментальних даних та математичного моделювання визначено оптимальні розчинники для екстракції ПАР штамів *Pseudomonas* (спирти та естери). Встановлено, що для виділення рамноліпідів штамів *Pseudomonas* sp. PS-17 та

*P. fluorescens* 8573 доцільно використовувати кислотне осадження з нагріванням супернатанту культуральної рідини, що збільшує вихід рамноліпідного біокомплексу на 20%. При дослідженні впливу рН на екстракцію ПАР штаму *P. aureofaciens* NB – найбільший вихід ліпідів (3,7 г/дм<sup>3</sup>) досягнуто за рН 11 за використання суміші етилацетату й ізопропанолу (2:1).

4. Раціональними формами цільових продуктів штамів *P. aureofaciens* NB-1, *P. fluorescens* 8573, *Pseudomonas* sp. PS-17 є культуральна рідина, супернатант культуральної рідини, рамноліпідний біокомплекс, рамноліпіди, надосадова рідина після осадження рамноліпідного біокомплексу, полігідроксиалконоати. Розроблена технологія дозволила зменшити відходи постферментаційної культуральної рідини. Поряд з цим показано можливість практичного використання економічно вигідного продукту – надосадової рідини.

5. Визначено високу активність та низьку токсичність отриманих ПАР (поверхневий натяг 26,5-28,5 мН/м, ККМ дирамноліпиду 138 мг/дм<sup>3</sup>, емульгувальна здатність ( $E_{24}$  50-100%), піноутворення (стійкість піни 50-90%), змочування поверхонь), а також їх вплив на проникність клітинних мембран різних мікроорганізмів. ПАР штамів *Pseudomonas* мають антимікробну дію щодо низки фітопатогенних бактерій і грибів.

6. Доведено можливість практичного застосування компонентів постферментаційної культуральної рідини штамів *Pseudomonas*. БіоПАР є ефективними для інтенсифікації очищення ґрунтів від нафтових вуглеводнів, зокрема швидкість розкладу бензпірену зростала за дії рамноліпідів на 18%. Супернатанти культуральних рідин штамів *P. fluorescens* 8573 та *P. aureofaciens* NB-1 є екологічно безпечними інгібіторами корозії сталі Ст3 – ступінь захисту становить 80-95%. Вперше встановлено ефективність рамноліпідних ПАР для «зеленого» синтезу наночастинок (середній діаметр одержаних AgNP – 40-50 нм). Доведено перспективність застосування ПАР у рослинництві як регуляторів росту рослин (при передпосівному обробленні насіння надземна маса рослин зростає у середньому на 19%, а коренева – на 30%).

7. Розроблено технологію та запропоновано апаратурно-технологічну схему промислового виробництва ПАР штаму *P. fluorescens* 8573, особливостями якої є застосування ферментера з вихровою системою аерації. Дана технологія дозволяє одержати 5 цільових продуктів для практичного застосування та мінімізувати кількість відходів переробки культуральної рідини.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Покин'яброда Т. Я., Хом'як С. В., Швед О. В., Парашин Ж. Д., Комаровська-Порохнявець О. З., Карпенко О. В., Вільданова-Марцишин Р. І., Федоришин Ю. І., Наконечний М. В., Новіков В. П. Очистка ґрунтів від нафтових забруднень біотехнологічними шляхами. *Вісник Національного університету «Львівська політехніка»*. Серія: «Хімія, технологія речовин та їх застосування». 2002. № 461. С. 208-211 (Наукове фахове видання України з технічних наук згідно постанови президії

ВАК України від 09.02.2000 р. №2-02/2). (Здобувач проводила культивування продуцента рамноліпідних ПАР, визначала кількості нафтопродуктів в процесі ремедіації).

2. Єрохін В. А., Покинсьброд Т. Я., Карпенко О. В., Новіков В. П. Дослідження росту та синтезу цільового продукту штамом *Pseudomonas species* PS-17 – продуцента позаклітинних біосурфактантів. *Вісник Національного університету «Львівська політехніка»*. Серія: «Хімія, технологія речовин та їх застосування». 2006. № 553. С. 124-127. (Наукове фахове видання України з технічних наук згідно постанови президії ВАК України від 09.02.2000 р. №2-02/2). (Здобувач проводила культивування продуцента рамноліпідних ПАР, визначення поверхнево-активних характеристик супернатанту).

3. Щеглова Н.С., Карпенко О. В., Покинсьброд Т.Я. Лубенець В.І., Швед О.В.. Гліколіпідні ПАР – екологічно безпечні стимулятори росту сільськогосподарських рослин. *Вісник НУ «Львівська політехніка»*. Серія: «Хімія, технологія речовин та їх застосування». 2007 №590. С.133-138 (Наукове фахове видання України з технічних наук згідно постанови президії ВАК України від 09.02.2000 р. №2-02/2). (Здобувач проводила культивування продуцента рамноліпідних ПАР та виділення ліпідів).

4. Малаховська-Ютш А., Покинсьброд Т., Карпенко Е. Деградація бензпирена почвенними мікроорганізмами в присутстві гліколипідів, синтезованих штамом *Pseudomonas* sp. PS-17. *Биотехнология*. 2007. № 3. С. 68 – 73 (Російська Федерація). (Здобувач проводила культивування продуцента рамноліпідних ПАР, їх виділення та приготування ґрунтового екстракту з бензпіреном та рамноліпідами).

5. Єрохін В. А., Покинсьброд Т. Я., Карпенко О. В. Поверхнево-активні препарати на основі продуктів біосинтезу штаму *Pseudomonas* sp. PS-17. *Наукові праці Донецького національного технічного університету*. Серія: *Хімія і хімічна технологія*. 2008. №134 (10). С. 111-117. Наукове фахове видання України з технічних наук згідно постанови президії ВАК України від 30.06.2004 р. №3-05/7). (Здобувач проводила культивування продуцента рамноліпідних ПАР та виділення ліпідів).

6. Єрохін В. А., Карпенко О. В., Покинсьброд Т. Я. Лубенець В. І.. Застосування методів математичного моделювання для визначення оптимальних умов мікробного синтезу поверхнево-активних речовин. *Вісник Національного університету «Львівська політехніка»*. Серія: «Хімія, технологія речовин та їх застосування». 2008. № 609. С. 135-140. (Наукове фахове видання України з технічних наук згідно постанови президії ВАК України від 09.02.2000 р. №2-02/2). (Здобувач проводила культивування продуцента рамноліпідних ПАР та виділення ліпідів, приймала участь у підготовці рукопису публікації).

7. Підбір оптимальних екстрагентів біологічно активних сполук на основі принципу лінійності вільних енергій. Т. Я. Покинсьброд, О. В. Карпенко, Р. Г. Макітра, О. Я. Пальчикова, Н. В. Роговик, В. І. Роговик. *Вісник Національного університету «Львівська політехніка»*. Серія: «Хімія, технологія речовин та їх застосування». 2008. № 622. С. 103-106. (Наукове фахове видання України з технічних наук згідно постанови президії ВАК України від 09.02.2000 р. №2-02/2). (Здобувач проводила культивування продуцента рамноліпідних ПАР, виділення ліпідів, приймала участь у підготовці рукопису публікації).

8. Покинсьброд Т.Я., Пирог Т.П., Карпенко О.В., Пристай М.В., Болібрух Л. Д. Синтез поверхнево-активних речовин штамом *Pseudomonas* sp. PS-17 на змішаних субстратах. *Вісник Національного університету «Львівська політехніка»*. Серія «Хімія,

технологія речовин та їх застосування». 2016. № 841. С. 210-217. (Наукове фахове видання України з технічних наук згідно наказу МОН України від 13.07.2015 р. № 747). (Здобувач проводила культивування продуцента рамноліпідних ПАР, виділення ліпідів, узагальнювала результати, приймала участь у підготовці рукопису публікації).

9. Kłosowska-Chomiczewska I.E., Mędrzycka K., Hallmann E., Karpenko E., Pokynbroda T., Macierzanka A., Jungnickel C. Rhamnolipid CMC prediction. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2017. Vol. 488. P. 10-19. (Журнал включено до таких баз даних: **Scopus**, AGRICOLA, Biological Abstracts, Chemical Abstracts тощо). (Здобувач проводила культивування продуцента рамноліпідних ПАР, виділення ліпідів, узагальнювала результати, приймала участь у підготовці рукопису публікації).

10. Покинсьброд Т.Я., Карпенко О.В., Зінь І.М. Нові поверхнево-активні речовини штаму *Pseudomonas aureofaciens* NB-1. *Наукові вісті НТУУ «КПІ»*. 2017. № 3(113). С. 71-76. (Наукове фахове видання України з технічних наук згідно наказу МОН України від 13.07.2015 р. № 747. Входить до міжнародних наукометричних баз даних: DOAJ, EBSCO, Index Copernicus, WorldCat, J-Gate, Google Scholar тощо). (Здобувач проводила культивування продуцента рамноліпідних ПАР, виділення ліпідів, узагальнювала результати, приймала участь у підготовці рукопису публікації).

11. Карпенко О.В., Волошинець В.А., Карпенко І.В., Семенюк І.В., Мідяна Г.Г., Покинсьброд Т.Я. Колоїдні характеристики водних систем рамноліпідного біокомплексу штаму *Pseudomonas sp.* PS-17 з TWEEN-80 та їх перспективи для біотехнології. *Наукові вісті НТУУ «КПІ»*. 2017. № 6. С. 7-13. (Наукове фахове видання України з технічних наук згідно наказу МОН України від 13.07.2015 р. № 747. Входить до міжнародних наукометричних баз даних: DOAJ, EBSCO, Index Copernicus, WorldCat, J-Gate, Google Scholar тощо). (Здобувач проводила культивування продуцента рамноліпідних ПАР, виділення ліпідів, узагальнювала результати, приймала участь у підготовці рукопису публікації).

12. Покинсьброд Т.Я., Карпенко О.В., Лубенець В. І., Мартинюк Н.Б., Зінь І.М. Біосинтез ПАР мікроорганізмами родів *Pseudomonas* на соєвій олії та дослідження їх властивостей. *Вісник Національного університету «Львівська політехніка»*. Серія «Хімія, технологія речовин та їх застосування». 2017. № 868. С. 222-229. (Наукове фахове видання України з технічних наук згідно наказу МОН України від 13.07.2015 р. № 747). (Здобувач проводила культивування продуцента рамноліпідних ПАР, виділення ліпідів, узагальнювала результати, приймала участь у підготовці рукопису публікації).

13. Патент України на корисну модель № 71792 А. Поверхнево-активний біопрепарат. Карпенко О.В., Мартинюк Н.Б., Шульга О.М., Покинсьброд Т.Я., Вільданова-Марцишин Р.І., Щеглова Н.С. 24.01.2004, Бюл.12. (Здобувач проводила культивування продуцента рамноліпідних ПАР та виділяла ліпіди).

14. Патент України на корисну модель №36704. Біопрепарат для бобових і злакових рослин. Лісова Н.Ю., Карпенко О. В., Щеглова Н.С., Вільданова-Марцишин Р.І., Покинсьброд Т.Я., Козуб Ю.Б., Галан М.С., Наконечний М.В. 10.11.2008, Бюл. №21. (Здобувач проводила культивування продуцента рамноліпідних ПАР, виділяла ліпіди, проводила культивування азотфіксуючих бактерій).

15. Karpenko E., Kolwzan B., Vildanova-Martysyshyn R., Scheglova N., Pokynbroda T., Grabas K. Method of remediation of soils from petroleum-products - enhanced cleaning by biosurfactants. *International Conf. on Bioremediation of Soil and Groundwater*, 5-8 September 2004. Sci. Mater. Cracow (Poland). 2004. P. 93.

16. Карпенко О., Вільданова-Марцишин Р., Щеглова Н., Покинсьброда Т., Шеремета Ю., Мартинюк Н., Брик Ж., Туровський А., Солтис М. Утилізація відходів нафтовидобувної промисловості – актуальна проблема Західного регіону. *Тези доп. 2 міжнар. конф. «Чистота довкілля в нашому місті»*. 2004. Трускавець. С.150-151.

17. Карпенко О.В., Колвзан Б., Грабас К., Щеглова Н.С., Покинсьброда Т.Я., Вільданова-Марцишин Р.І., Макітра Р.Г., Мартинюк Н.Б., Шеремета Ю.Б. Нові препарати для знешкодження відходів нафтовидобувної промисловості. *Тези доп. 2-ої Всеукраїнської наук.-практ. конф. “Біотехнологія. Освіта. Наука”*. Збірник наук. праць. Львів. 2004. С. 150-151.

18. Покинсьброда Т., Єрохін В., Карпенко О., Щеглова Н., Вільданова-Марцишин Р., Лубенець В., Новіков В., Солтис М. Методи отримання поверхнево-активних ліпідів для нових фармпрепаратів. *Тези доп. 2-ої Всеукраїнської наук.-практ. конф. “Біотехнологія. Освіта. Наука”*. Збірник наук. праць. Львів. 2004. С.83.

19. Карпенко О., Щеглова Н., Вільданова-Марцишин Р., Лісова Н., Покинсьброда Т., Туровський А. Регуляція синтезу полісахаридів азотфіксуючих бактерій. *Зб. наук. праць за матеріалами 10-ї наук. конф. «Львівські хімічні читання-2005»*, (Львів, 25-27 травня 2005 р.). М-во освіти і науки України, Львів, нац. універ. ім.Франка. Львів, видавнич. центр Львів. нац. універ. ім.Франка, 2005. С. Д8.

20. Карпенко О., Щеглова Н., Вільданова-Марцишин Р., Шульга О., Покинсьброда Т., Туровський А. Екологічна роль поверхнево-активних речовин мікробного походження. *Зб. наук. праць 10-ї наук. конф. «Львівські хімічні читання-2005»*. Львів, 25-27 травня 2005 р. М-во освіти і науки України, Львів. нац. універ. ім.Франка. Львів, видавнич. центр Львів. нац. універ. ім. Франка, 2005. С.

21. Karpenko E., Hafiychuk H., Pokynbroda T., Yerokhin V. Mathematical modeling and optimization of methabolic process in biotechnology. *Annual Conference in Ukraine. Statistical Physics 2005: Modern Problems and New Applications*. Book of abstracts. 28-30 August 2005. Lviv. P. 140.

22. Karpenko E., Kolwzan B., Pokynbroda T., Martynyuk N., Lubenets V., Grabas K., Novikov V., Gvozdjak P., Fedoryshyn Y. Biologiczne metody oczyszczania srodowiska z zanieczyszczen naftowych stosowane na Ukrainie. *Zanieczyszczenie srodowiska produktami naftowymi I innymi antropogennymi zanieczyszczeniami organicznymi, ich analityka, monitoring i usuwanie*. Ustronie Morskie, May 18-21.05.2005. С.41-48.

23. Єрохін В.А., Покинсьброда Т.Я., Карпенко О.В. Застосування методів математичного моделювання для визначення оптимальних умов для мікробного синтезу поверхнево активних речовин. *II Міжнародна конференція “Молодь та поступ біології”*. Зб. тез доп. Львів, ЛНУ ім. І.Франка. 2006 р. С.291.

24. Єрохін В.А., Покинсьброда Т.Я., Карпенко О.В., Новіков В.П. Розробка методу виділення біоПАР з культуральної рідини *Pseudomonas species PS-17*. *III Всеукраїнська*

науково-практична конференція „Біотехнологія. Освіта. Наука”. Зб. тез доп. Харків: НУ „ХПІ”. 2006 р. с.111.

25. Pashynska V., Glamazda A., Plokhotnichenko A., Karpenko E., Pokynbroda T., Karachevtsev V. Spectroscopic investigations of carbon nanotubes in aqueous suspensions with biosurfactants. *XXIX th European Congress on Molecular Spectroscopy EUCMOS 2008*. August 31-September 5. 2008. Opatija, Croatia. Book of Abstracts. P.171.

26. Пристай М.В., Покинсьброда Т.Я., Карпенко О.В., Макітра Р.Г. Оцінка екстракційної здатності розчинників при виділенні біологічних поверхнево-активних речовин. *Тези доп IV міжнародної науково-практичної конференції „Біотехнологія. Наука Освіта. практика”*. 11-13 листопада 2008 р. Дніпропетровськ: УДХТУ. 2008. С.51-52.

27. Макітра Р.Г., Карпенко О.В., Покинсьброда Т.Я., Роговик В.І., Пальчикова О.Я., Роговик Н.В. Прогнозування розподілу біологічно активних речовин між органічною та водною фазами. *Тези доп. нац. наук.-прак. конференції з міжнар. участю «Актуальні проблеми синтезу і створення нових біологічно активних сполук та фарм. препаратів»*, Львів, 15-18 жовтня. 2008. Вид. «Львівська політехніка». С.161.

28. Покинсьброда Т., Пристай М., Єрохін В., Карпенко О. Зміна проникності клітинних мембран під впливом біогенних поверхнево-активних речовин. *V міжнар. конф. “Молодь та поступ біології”*. Зб. тез доп. Львів, ЛНУ ім. І.Франка. 2009 р. Т.2. С.197.

29. Карпенко І.В., Покинсьброда Т.Я., Карпенко О.В., Баранов В.І. Стимулювання росту рослин мікроорганізмами роду *Pseudomonas*. *Матеріали наук. конференції “Стан і біорізноманіття екосистем Шацького національного парку”*. Шацьк. 10–13 вересня 2015 р. С.37-38.

30. Pokynbroda T.Y., I.V. Karpenko, V.P. Novikov, V.I. Baranov, O.V. Karpenko. The biosynthesis products of the bacteria of genus *Pseudomonas* for plant cultivation. *International Scientific Congress «Modern directions in chemistry, biology, pharmacy and biotechnology»*. 29 September – 2 October 2015. Lviv. Ukraine. P. 80.

31. Покинсьброда Т.Я., Карпенко О.В. Синтез біосурфактантів штамами *Pseudomonas* на відходах виробництва біодизелю. *Матеріали міжнар. наук.-прак. інтернет-конф. «Біотехнологія: досвід, традиції та інновації»*. 14-15 грудня 2016 р. С.155-160.

32. Зінь Я.І., Хлопик О.П., Покинсьброда Т.Я. Вплив розмірів катодних включень на корозію модельних зразків алюмінієвого сплаву. *Матеріали відкритої науково-технічної конференції молодих науковців і спеціалістів ФМІ ім. Г.В. Карпенка НАН України КМН-2017*. Львів-2017. С. 70-75.

33. Зінь І.М., Тимусь М.Б., Хлопик О.П., Покинсьброда Т.Я. Інгібування корозії дюралюмінієвого сплаву (Д16Т) рамноліпідним біокомплексом (РБК) та супернатантом культуральної рідини (СКР) у корозивних середовищах. *Матеріали XIII міжнар. наук.-тех. конференції “ABIA-2017”*. 19-21 квітня. Київ 2017. С. 27.99.

34. Наконечна А.В., Баня А.Р., Карпенко А.Я., Хомяк С.В., Покинсьброда Т.Я., Швець В.В., Новиков В.П., Лубенець В.И. Использование тиосульфатов в комплексной



фиторемедиации загрязненной нефтью почвы. *Материалы XIII междунар. науч.-практ. конф. «Технологические аспекты современного аграрного производства и охраны окружающей среды»*. 8-11 ноября 2017. Алматы, Казахстан. С. 47-48.

35. Семенюк И.В., Баня А.Р., Покинсьброда Т.Я., Мидяна Г.Г., Карпенко Е.В. Влияние гуминовых композиций на ростовые показатели пшеницы озимой. *Материалы XIII междунар. науч.-практ. конф. «Технологические аспекты современного аграрного производства и охраны окружающей среды»*. 8-11 ноября 2017, Алматы, Казахстан. С. 73-75.

36. Karpenko E., Lisova N., Scheglova N., Vildanova R., Pokynbroda T., Hamkalo Z. The perspectives of using ecologically safe surfactants for agriculture. In: *Development in production and use of new agrochemicals. Chemistry for Agriculture*. Edited by H. Gorecki, Zb. Dobrzanski, P. Kafarski. Chem-Pol Trade. 2005. Vol.6. P. 786–793. (Здобувач проводила культивування продуцента рамноліпідних ПАР та їх виділення).

37. Карпенко Е. В., Покинсьброда Т.Я., Макитра Р.Г., Пальчикова Е.Я. Оптимальные методы выделения биогенных поверхностно-активных рамнолипидов. *Журнал общей химии*. 2009. Т. 12. С. 2011-2014. (Здобувач проводила культивування продуцента рамноліпідних ПАР, виділення ліпідів, приймала участь у підготовці рукопису публікації).

38. Гвоздяк Р. І., Пасічник Л. А., Ващенко Л. М., Покинсьброда Т. Я., Карпенко О. В. Синтез сурфактантів штамми *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* та *Pseudomonas syringae* pv. *Atrofaciens*. *Мікробіологічний журнал*. 2009. Т. 71. №3. С. 10 – 14. (Здобувач проводила культивування продуцента рамноліпідних ПАР, виділення ліпідів, узагальнювала результати, приймала участь у підготовці рукопису публікації).

## АНОТАЦІЯ

**Покинсьброда Т.Я. Біотехнологія поверхнево-активних продуктів бактерій роду *Pseudomonas*, їх властивості та застосування.** – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата технічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського», Київ, 2018.

Дисертація присвячена дослідженню процесів біосинтезу ПАР штамми *Pseudomonas* sp. PS-17, *P. fluorescens* 8573 та *P. aureofaciens* NB-1 на гідрофобних, гідрофільних субстратах і їх сумішах, а також на відходах виробництв (технічному гліцерині), дослідженню фізико-хімічних і біологічних властивостей біоПАР та їх практичному застосуванню. Встановлено, що бактеріальні штами *P. aureofaciens* NB-1 та *P. fluorescens* 8573 є новими перспективними продуцентами біоПАР. Оптимізовано умови синтезу ПАР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17. Розроблено методи виділення біоПАР (осадження, екстракція). БіоПАР досліджених штамів мають антимікробну дію щодо низки фітопатогенів, є малотоксичними сполуками. Доведено їх ефективність для регуляції росту рослин, інтенсифікації очистки ґрунтів від нафтових вуглеводнів, до синтезу наночастинок та інгібування корозії сталі. На основі отриманих результатів розроблено апаратно-технологічну схему промислового виробництва рамноліпідних ПАР штаму *P. fluorescens* 8573.



**Ключові слова:** *Pseudomonas*, біоПАВ, рамноліпіди, фізико-хімічні і біологічні властивості, інгібітори корозії, препарати для рослин, антимікробна дія.

### АННОТАЦИЯ

**Покинъброда Т.Я. Биотехнология поверхностно-активных продуктов бактерий рода *Pseudomonas*, их свойства и применение.** – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 03.00.20 - биотехнология. - Национальный технический университет Украины «Киевский политехнический институт Имени Игоря Сикорского», Киев, 2018.

Диссертация посвящена исследованию процессов биосинтеза ПАВ штаммами *Pseudomonas* sp. PS-17, *P. fluorescens* 8573 и *P. aureofaciens* NB-1 на гидрофобных, гидрофильных субстратах и их смесях, отходах производств (технический глицерин), исследованию физико-химических и биологических свойств биоПАВ, их практическому применению. Установлено, что бактериальные штаммы *P. aureofaciens* NB-1 и *P. fluorescens* 8573 являются новыми перспективными продуцентами рамнолипидных ПАВ. Оптимизированы условия синтеза ПАВ штаммом *Pseudomonas* sp. PS-17. Разработаны методы выделения биоПАВ (осаждение, экстракция). БиоПАВ исследованных штаммов обладают антимикробным действием в отношении ряда фитопатогенов и являются малотоксичными соединениями. Доказана их эффективность для регуляции роста растений, интенсификации очистки почв от нефтяных углеводородов, синтеза наночастиц и ингибирования коррозии стали. На основе полученных результатов разработана аппаратно-технологическая схема промышленного производства биоПАВ на примере штамма *P. fluorescens* 8573.

**Ключевые слова:** *Pseudomonas*, биоПАВ, рамнолипиды, физико-химические и биологические свойства, ингибиторы коррозии, препараты для растений, антимикробное действие.

### SUMMARY

**Pokynbroda T.Ya. Biotechnology of surface-active products of the bacteria of *Pseudomonas* genus, their properties and application.** – Qualifying scientific work on the rights of manuscripts.

Thesis for the degree of a candidate of technical sciences in the specialty 03.00.20 – biotechnology. – Department of Physical Chemistry of Fossil Fuels InPOCC of National Academy of Sciences of Ukraine. – National Technical University of Ukraine “Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute” (Ministry of Education and Science of Ukraine). Kyiv, 2018.

Surfactants are widely used in modern industry, agriculture, environmental restoration, medicine. However, synthetic surfactants are environmentally hazardous. Advantages of products of microbial synthesis (biosurfactants) – high efficiency, stability in various temperatures and pH, biological activity, as well as biodegradability and low toxicity.

The aim of the work was the development of biotechnology for the synthesis of surface-active substances of the strains *Pseudomonas fluorescens* 8573, *Pseudomonas aureofaciens*

NB-1, *Pseudomonas* sp. PS-17 by optimizing the cultivation conditions and isolation, studying the physico-chemical, biological properties, establishment of the practical potential.

The new, promising producers of surfactants – the strains of *P. fluorescens* 8573 and *P. aureofaciens* NB-1 were selected. It was shown that these strains synthesize the surfactants of two types – rhamnolipids and lipopeptides. Methods for increasing the efficiency of surfactants biosynthesis by the *Pseudomonas* strains have been developed. Efficiency of the mixed substrates using was established: the yield of products was significantly increased and the synthesis duration was reduced. Rational methods of isolation and extraction of surfactants, in particular by mathematical methods have been developed. The use of a new cheap product – supernatant after biocomplex precipitation (SLC), which is a by-product, has been proposed. The ability of surfactant of *Pseudomonas* sp. PS-17 to activate the benzpyrene biodegradation has been established. The products of *P. fluorescens* 8573 and *P. aureofaciens* NB-1 can inhibit the corrosion of metals and stimulate plant growth. Also, the rhamnolipids efficiency for the "green" synthesis of silver nanoparticles has been shown.

The technologies for the preparation of surface-active products using strains *P. fluorescens* 8573, *P. aureofaciens* NB-1 and *Pseudomonas* sp. PS-17, including economically viable (vegetable oils, waste from biodiesel production) and mixed substrates, an instrument-technological scheme for the production of biosurfactants was proposed. *P. fluorescens* 8573. The rational ways of isolating biosurfactants have been developed, which can be recommended for industrial production. The perspectives of using rhamnolipid surfactants as environmentally safe inhibitors of metal corrosion, as well as the mean for plant growing and protection were established. The practical significance of the results is confirmed by appropriate implementation acts and Patents of Ukraine. It was shown that the using of mixed substrates contributed to the increased yields of the products if compared to the media with monosubstrates. When using the mixture of glycerol with hexadecane as carbon sources the final concentration of surfactants has been increased by 1,8 times and the duration of the synthesis has been shorter by 3 days. The processes of biosurfactants separation were optimized: precipitation of the biocomplexes from post-fermentative culture liquid supernatant (CLS) by adjusting temperature regime. The optimal solvents for the rhamnolipid surfactants extraction from biocomplexes and CLS were determined by the mathematical method of linear multiparameter equations. Physico-chemical and biological properties of the obtained surfactants of *Pseudomonas* strains were established: emulsification, solubilization of various hydrophobic substances, surface activity, wetting of different surfaces, the biosurfactants influence on the permeability of cell membranes of microorganisms, toxicity. The antimicrobial activity of surfactants against phytopathogen bacteria and fungi was shown. A regulating influence of the synthesized surfactants on the growth of various plants was established. The prospects of the obtained biosurfactants using in modern agriculture for means of plant growth and plant protection were established. Biosurfactants are effective for intensifying the purification of soils from petroleum hydrocarbons. In particular, the rate of the benzpyrene degradation increased by 18% with the rhamnolipids. CLS of strains *P. fluorescens* 8573 and *P. aureofaciens* NB-1 are environmentally safe steel corrosion inhibitors – the degree of protection is 80-95%. The

technology process, the flow and equipment diagrams for the industrial production of the biosurfactants of *P. fluorescens* 8573 strain were developed. This technology allows obtaining 5 types of target products for practical using. The proposed approach allowed to minimize the by-products of processing of the culture liquid. The non-waste production with the use of practically all of the components of postfermentation CLS, eliminating extraction with solvents was suggested. These results have an ecological and economic advantages.

On the theme of the dissertation, 38 works were published, among them: 12 scientific articles (including 2 articles in foreign journals, 2 articles in domestic journals, presented in international science-computer databases), 2 articles in others scientific editions, 2 Patents of Ukraine, 21 proceeding of conferences.

**Key words:** *Pseudomonas*, biosurfactants, rhamnolipids, physico-chemical and biological properties, corrosion inhibitors, plant growth regulators, antimicrobial activity.